

赤色蛍光強発現遺伝子導入マウスにおける 蛍光発現部位の形態学的検討

桑島 幸紀, 大塚 正人*, 石崎 明**, 藤村 朗***

岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座歯科矯正学分野

*東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

**岩手医科大学学生化学講座細胞情報科学分野

***岩手医科大学解剖学講座機能形態学分野

(主任：三浦 廣行 教授)

(受付：2011年12月26日)

(受理：2012年1月7日)

赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス (tdTomato マウス) は再生医療研究のバイオイメージングにおいて有望視されている実験動物である。特に、このマウスから採取した組織再生性細胞や組織片をヌードマウスなどの重症複合免疫不全マウスに移植してその組織再生能力を評価する実験系においては、移植後の細胞や組織片の体内動態をその赤色強蛍光を追跡することによりリアルタイムに観察できると期待されている。しかし、このマウスと既存の緑色蛍光強発現遺伝子導入マウス (EGFP マウス) とのバイオイメージングに関する有用性を比較した例はない。今回、我々は tdTomato マウスの成体において IVIS® Lumina Imaging System を用いて蛍光シグナル強度を測定し、EGFP マウスと比較検討した。さらに同一試料における各蛍光タンパクの mRNA 発現量を計測し、蛍光イメージングの結果と比較した。また tdTomato マウスについては、生後7日齢を用いて全身の凍結連続切片を作製し、各臓器における組織レベルでの蛍光発現の詳細な検索を行い、蛍光イメージングならびに mRNA 発現量との比較を行った。

Anatomical analyses on the expression of the fluorescence in tdTomato transgenic mice

Yukinori KUWAJIMA, Masato OOTUKA, Akira ISHIZAKI, Akira FUJIMURA

Division of Orthodontics, Department of Developmental Oral Health Science, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate, 020-8505, Japan

Division of Basic Molecular Science and Molecular Medicine, Department of Molecular Life Science, School of Medicine, Tokai University

143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan

Division of Cellular Biosignal Sciences, Department of Biochemistry, Iwate Medical University

2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-Cho, Shiwa-Gun, Iwate, 028-3694, Japan

Division of Functional Morphology, Department of Anatomy, Iwate Medical University

2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-Cho, Shiwa-Gun, Iwate, 028-3694, Japan

(Chief : Prof. Hiroyuki MIURA)

その結果、tdTomato マウスより摘出されたほぼ全ての臓器において、IVIS[®] Lumina Imaging System による高い蛍光シグナル強度が認められたが、EGFP マウスでは肝臓、脾臓、腎臓において顕著な蛍光発現が認められず、EGFP の発現に臓器特異性が存在する可能性が示唆された。また各臓器の tdTomato mRNA 発現量も IVIS[®] Lumina Imaging System により観察された蛍光シグナル強度と同様の傾向を示した。加えて、tdTomato マウスの組織切片による観察では、ほとんどの臓器の細胞で蛍光発現を確認できた。しかしながら、蛍光イメージング、mRNA 発現量、組織切片による観察結果において、同様の傾向を示さない臓器も認められたことから、今後、このような研究や検証には切片法を含めた複数の手法を用いる必要が示唆された。

以上の結果から総合して判断すると、tdTomato マウスは、既存の EGFP マウスと比較して、その移植実験への応用性の点で有用性が高いことが示唆された。

緒 言

再生医療の研究においてバイオイメージング技術は、重要な手法となっている¹⁻¹⁰⁾。生体研究において、移植した細胞や臓器が期待通りに増殖、生着しているかの判定には、生きた個体内での長期モニタリングが必須である。

また癌研究においても、様々な蛍光タンパクや蛍光化合物によって標識された癌細胞を重症複合免疫不全マウスに移植し、転移を追跡した報告¹¹⁾もなされており、今後さらに、生きた個体内で経時的にかつ非侵襲的な光学的追跡が期待されている。

近年、*Aequorea Victoria* (オワンクラゲ) から単離された緑色蛍光タンパクである Green Fluorescent Protein (GFP)¹²⁻¹⁴⁾をはじめとする様々な、蛍光タンパクを利用したイメージングの研究¹⁵⁻¹⁸⁾がなされているが、生体内に移植した細胞や臓器を体表から観察するためには、強い蛍光強度が必要となり、かなりの集積をみなければ観察できないことがある。

今回使用した赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス (tdTomato マウス) は、大塚らが独自に開発したトランスジェニックマウスの1つで、CAG プロモーター¹⁹⁻²³⁾下に連結した赤色蛍光タンパク tandem dimer Tomato (tdTomato) の cDNA を Rosa26 遺伝子座上に導入することにより作製されている²⁴⁾。導入されている tdTomato は、サンゴから単離された DsRed に改変を加えて作製された7種類のフルーツ蛍光

タンパク (CLONTECH, Laboratories, Inc. A Takara Bio Company)²⁵⁻²⁷⁾のひとつであり、dimeric Tomato (dTomato) 遺伝子をタンデムにつなぎ合わせ、効率よく2量体を形成するように設計されている。そのため、他のフルーツ蛍光タンパクと比べると蛍光強度が強く、非常に明るい蛍光シグナルが得られることから、細胞数が少なくても体表からの観察が可能になり、生体内での移植細胞の増殖や移植臓器の生着確認には適していると推測される。大塚ら²⁴⁾によって、mCFP, mCitrine, mOrange, tdTomato のそれぞれの蛍光タンパクにおいて、胃、肝臓、胸腺、筋、耳、腸、心臓、腎臓、脳、肺の各臓器における蛍光イメージングの報告はなされているが、その他の各臓器における蛍光発現分布の研究はなく、特に組織レベルあるいは mRNA レベルでの tdTomato 遺伝子発現の精査はされていない。そこで、本研究では、tdTomato マウス全身の連続切片における臓器別構成要素である組織の蛍光発現分布と各臓器における tdTomato mRNA 発現量を比較した。さらに、これらの結果と、既存の EGFP マウス各臓器における EGFP 発現の様子との比較検討を試みた。

材料・方法

1. 対象動物と飼育条件

検索には、切片作製用に生後7日齢の遺伝子型が hemi 接合体である tdTomato マウス5匹を用いた (図1)。蛍光イメージングおよび

mRNA 発現量測定用に tdTomato マウス (3 か月齢) と同じく蛍光イメージングに用いられている緑色蛍光強発現遺伝子導入マウス (EGFP マウス)²⁸⁾ (3 か月齢) を比較対照として各 1 匹を用いた。動物は、岩手医科大学医歯薬総合研究所動物研究センター P1A 室 (室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $60 \pm 10\%$) で飼育し, CE-2 (γ 線滅菌済み) 固形飼料 (CLEA Japan, INC., Tokyo, Japan) と濾過水は自由摂取とした。本研究は、岩手医科大学動物実験委員会の許可 (実験計画書承認番号 21-039) を受け, 岩手医科大学動物実験指針ならびに動物の保護および管理に関する法律に従って実施した。

2. 検索方法

1) 組織学的観察

(1) 全身非脱灰凍結連続切片の作製

tdTomato マウスを, 炭酸ガスにて屠殺後, 4% Paraformaldehyde / PBS を用いて, 室温で 1 週間, 固定を行った。凍結包埋前に固定試料を 7% sucrose / PBS 溶液で室温下にて浸透した後, 液体窒素にて -100°C に冷却したイソペンタン中でクライオフィルム・トランスファーキットのステンレスコンテナにて, 5%



図 1 tdTomato マウス腹側写真

Carboxymethyl cellulose (KANTO CHEMICAL, CO., Tokyo, Japan) で凍結包埋を行った。凍結包埋試料を cryostat (CM3050S[®], Leica, Bensheim, Germany; cutting edge angle: 5° , CT- 22°C OT- 22°C) を用いてスチール替刃 (Leica 818 High Profile Microtome Blades, Leica, Bensheim, Germany) でフィルムトランスファー法 (川本法)^{29,30)} (Cryofilm TYPE. I-B[®], Leica, Tokyo, Japan) にて, 非脱灰 $10 \mu\text{m}$ 厚矢状凍結連続組織切片を作製した。

(2) 蛍光観察

作製した連続切片を 100% エタノールを通してカバーガラスに接着を施した後, 30% 無蛍光グリセリンにてスライドガラスを用いて二重封入を行った (図 2)。観察には, HS オールインワン 蛍光顕微鏡 (BIOREVO[®], BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan) を用いて明視野と暗視野にて行った。蛍光観察, 撮影の条件は, 蛍光フィルタ Texas Red (OP-66838 BZ フィルタ) を用いて, 励起波長 $560/40 \text{ nm}$, 吸収波長 $630/60 \text{ nm}$, ダイクロイックミラー波長 595 nm とした。その後, コンピューター上で解析ソフト (BZ-画像解析アプリケーション; Keyence, Osaka, Japan) を用いて明視野像と暗視野像, それぞれのイメージジョイント像の作製を行った。また連続切片の一部は, 通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) を行い, 明視野で組織構造の観察を行った。

2) 摘出臓器の蛍光イメージング

tdTomato マウスと EGFP マウスを炭酸ガスで屠殺後, すべての臓器を摘出した。それぞれの摘出した臓器を, IVIS[®] Lumina Imaging System (Xenogen, Co., California, USA) を用いて蛍光イメージングを行った。tdTomato の検出には, DsRed フィルターセット, GFP の検出には, GFP フィルターセットを用いた。

3) リアルタイム逆転写-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

IVIS[®] Lumina Imaging System による観察後, 各臓器の一部をトリミングし RNA 抽出のための試料とした。RNA の抽出は, RNA 抽出

試薬 ISOGEN[®] (Nippongene, Toyama, Japan)を用いて、通法に従って行った。抽出した total RNA の濃度は、260 nm の吸光度を測定することにより算出した。total RNA から cDNA を合成するための逆転写反応は、PrimeScript[®] RTMaster Mix (Takara Bio, Ohtsu, Japan) を用いて、通法に従って行った。合成された cDNA を含む溶液 10 μ l に滅菌蒸留水 70 μ l を加えて RT-PCR のための鋳型とした。リアルタイム RT-PCR は、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Takara Bio, Ohtsu, Japan) を用いて SYBR Green 法により行った。鋳型 cDNA 8 μ l に 10 μ l の 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™], 1 μ l の 10 μ M センスプライマー (PCR Forward Primer), 1 μ l の 10 μ M アンチセンスプライマー (PCR Reverse Primer) を加えて、98 $^{\circ}$ C で 5 秒の熱変性、60 $^{\circ}$ C で 30 秒のアニーリングと伸長反応を 1 サイクルとした 2 step PCR を 40 サイクル行った。センスまたはアンチセンスプライマーの塩基配列次の通りである: tdTomato

(5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGTCA-3', 5'-TCGAACCTCGTGCCGTTTCATGGAGC-3'), EGFP (5'-CAACAGCCACAACGTTATATCATG-3', 5'-ATGTTGTGGCGGATCTTGAAG-3'), Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'). tdTomato mRNA および EGFP mRNA の発現量は $\Delta\Delta$ Ct 法によりハウスキーピング遺伝子である Gapdh を対照とした値を算出した。

結 果

1. IVIS[®] Lumina Imaging System による摘出臓器の肉眼的ならびに光学イメージングの所見

tdTomato マウスと EGFP マウスから、脳、脊髄、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、顎下腺、涙腺、頭頂骨、脛骨、皮膚、口蓋粘膜、頬粘膜、咬筋、舌、膀胱、心臓、下行大動脈、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝

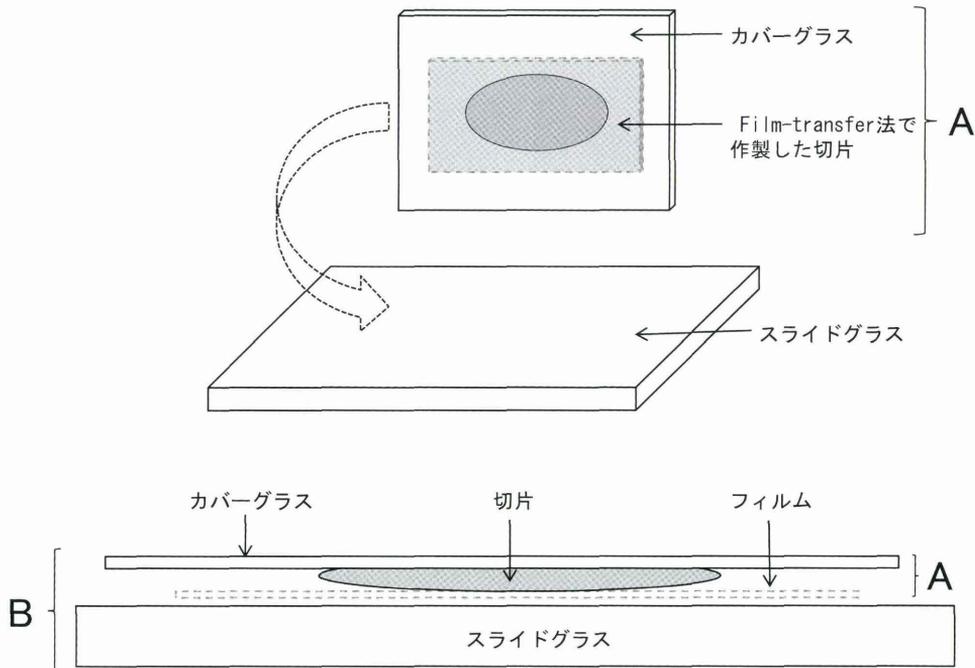


図2 二重封入法

フィルムトランスファー法で作製後の一次封入 (A), スライドガラスを用いた二次封入 (B)

臓, 膵臓, 腎臓, 肺を摘出した。

肉眼的には, tdTomato マウスの全ての臓器 (骨は除く) で赤色であることが確認できた (図 3, a)。一方, EGFP マウスでは, 顎下リンパ節, 顎下腺, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 下行大動脈, 頭頂骨, 脊椎において緑色を確認できなかった

(図 3, b)。

光学的イメージングの所見は次の通りである。

1) tdTomato マウス

骨を除く, 摘出した全ての臓器で蛍光を検出した。ほぼ全ての臓器において強い蛍光を示し

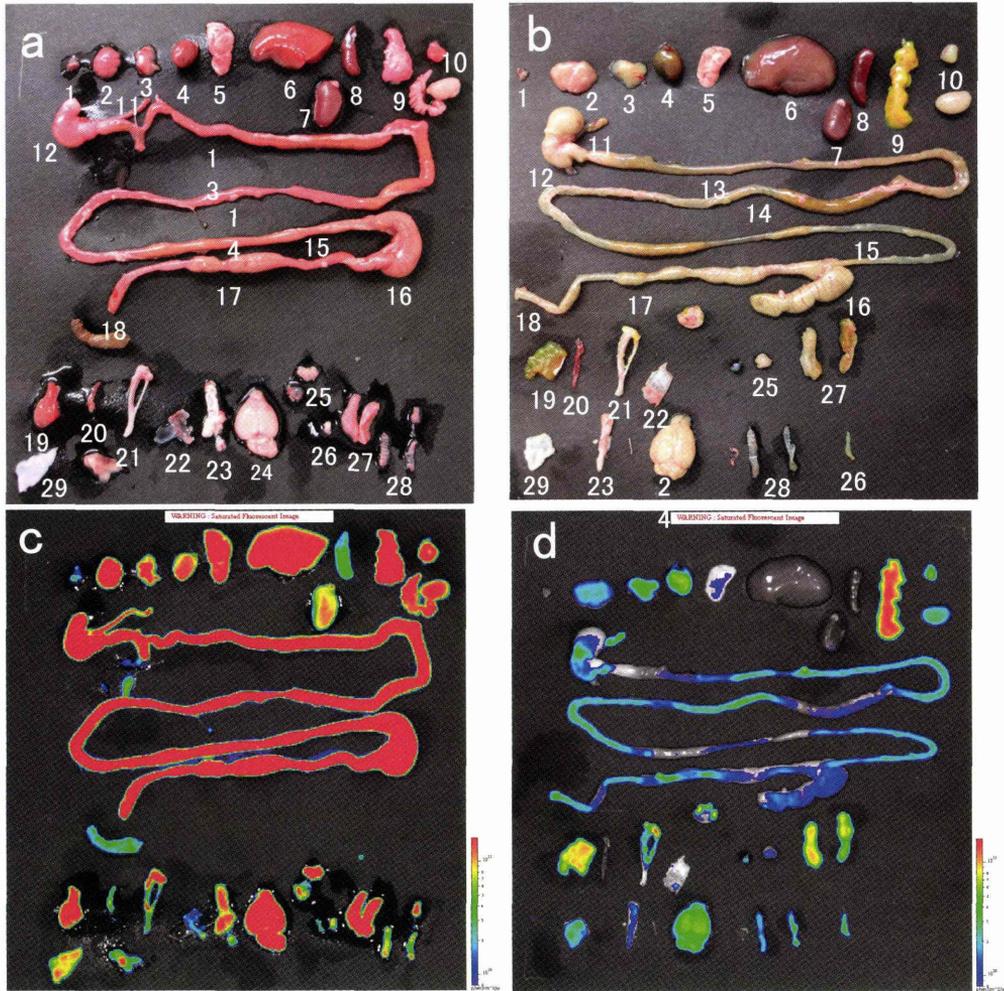


図 3 摘出臓器別 IVIS® Lumina Imaging System での蛍光イメージング

- a) tdTomato マウス摘出臓器
- b) EGFP マウス摘出臓器
- c) tdTomato マウス蛍光イメージング
- d) EGFP マウス蛍光イメージング

- 1. 顎下リンパ節, 2. 顎下腺, 3. 胸腺, 4. 心臓, 5. 肺, 6. 肝臓, 7. 腎臓, 8. 脾臓, 9. 膵臓, 10. 膀胱, 11. 食道,
- 12. 胃, 13. 十二指腸, 14. 空腸, 15. 回腸, 16. 盲腸, 17. 結腸, 18. 直腸, 19. 咬筋, 20. 大動脈, 21. 脛骨,
- 22. 頭頂骨, 23. 脊椎, 24. 脳, 25. 涙腺, 26. 頬粘膜, 27. 舌, 28. 口蓋粘膜, 29. 皮膚

たが、顎下リンパ節と脾臓では、他の臓器に比べて蛍光が弱かった（図3, c）。

2) EGFP マウス

顎下リンパ節、肝臓、脾臓、腎臓、大動脈、頭頂骨において蛍光を検出できなかった。肺、涙腺、顎下腺では弱い蛍光を検出した。胸腺、心臓、膀胱、咬筋、舌、皮膚、脳においては強い蛍光を認めた。消化管は全体的には顎下腺と同じレベルの蛍光を認めた（図3, d）。

2. 臓器別における蛍光タンパク質 mRNA の

発現

摘出臓器の一部を使用して、tdTomato マウスの各臓器間における tdTomato mRNA 発現量を検索した。その結果、肝臓と肺で高い tdTomato mRNA 発現が認められたが、顎下リンパ節では他の臓器と比較してその発現は少なかった。その他の臓器間で tdTomato mRNA 発現に著しい差は認められなかった（図4, a）。一方、比較対象として用いた EGFP マウスでは膀胱で高い EGFP mRNA の発現が認められた

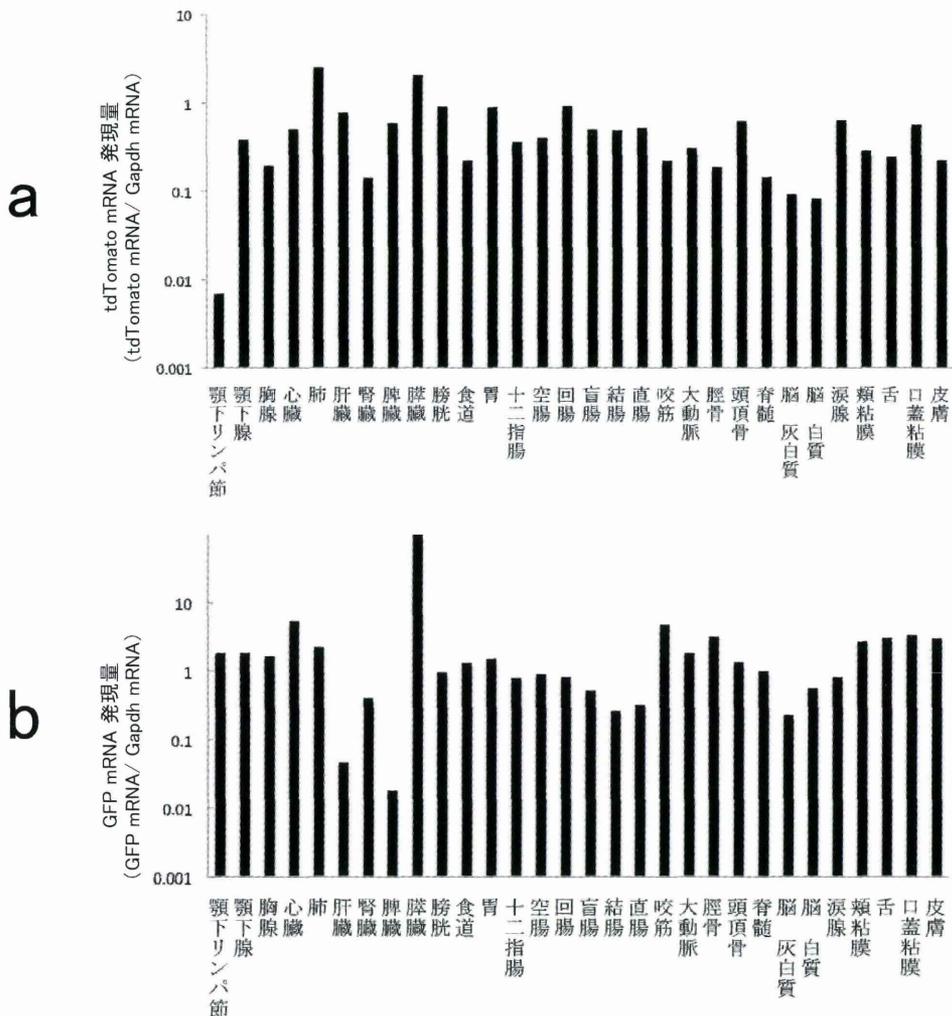


図4 摘出臓器別 mRNA 発現量
a) tdTomato マウス tdTomato mRNA 発現量
b) EGFP マウス GFP mRNA 発現量

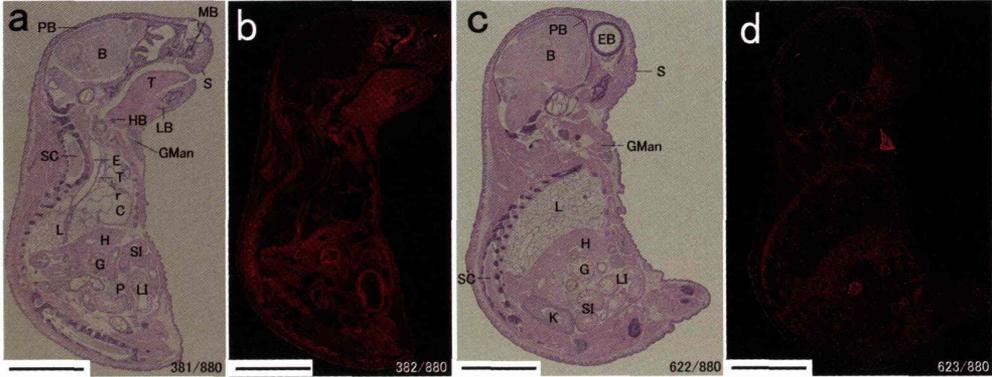


図5 tdTomato マウス全身の組織像

右下の番号は、10 μ m 厚連続切片の880枚中の番号を示す。

a, c) 明視野 (H-E 染色像) (bar: 5mm)

b, d) 暗視野 (bar: 5mm)

S: 皮膚, EB: 眼球, PB: 頭頂骨, B: 脳, SC: 脊髄, MB: 上顎骨, LB: 下顎骨, HB: 舌骨,
T: 舌, GMan: 顎下腺, Tr: 気管, E: 食道, C: 心臓, L: 肺, H: 肝臓, G: 胃, K: 腎臓, LI: 大腸,
SI: 小腸, P: 膵臓

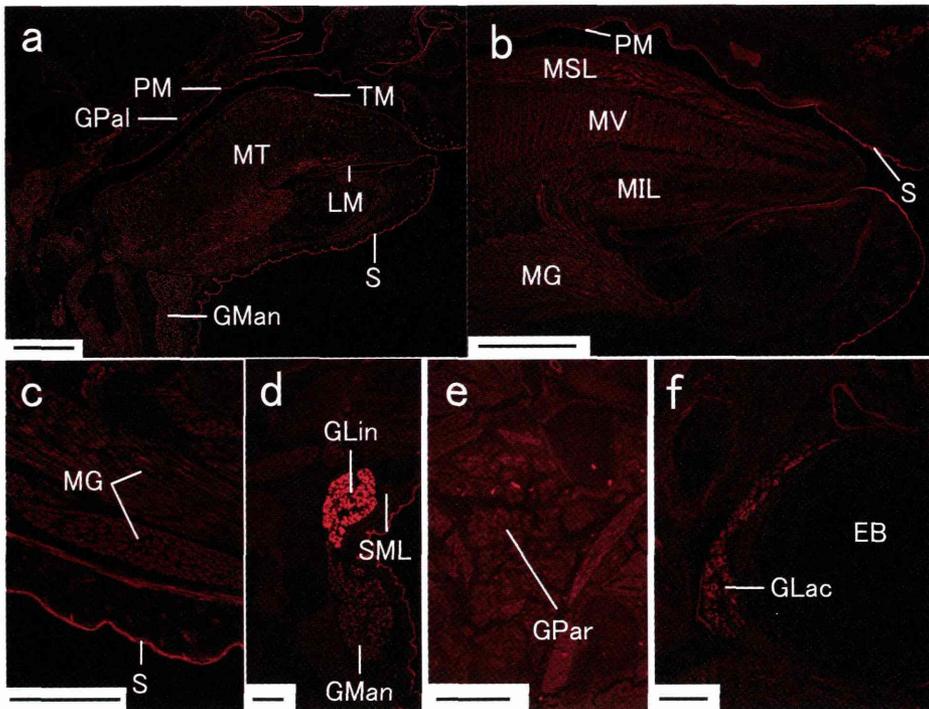


図6 tdTomato マウスの口腔およびその周囲の暗視野組織像

a) 口腔粘膜, 筋群 (bar: 1 mm) b) 舌筋群, 粘膜拡大像 (bar: 1 mm)

c) 舌骨筋群, 皮膚拡大像 (bar: 500 μ m) d) 顎下腺, 舌下腺拡大像 (bar: 500 μ m)

e) 耳下腺拡大像 (bar: 500 μ m) f) 涙腺拡大像 (bar: 500 μ m)

PM: 口蓋粘膜, TM: 舌背粘膜, LM: 舌下粘膜, GPal: 口蓋腺, MT: 舌筋, MSL: 上縦舌筋, MIL: 下縦舌筋, MV: 垂直舌筋, MG: オトガイ舌筋, GLin: 舌下腺, GPar: 耳下腺, GLac: 涙腺, SML: 顎下リンパ節

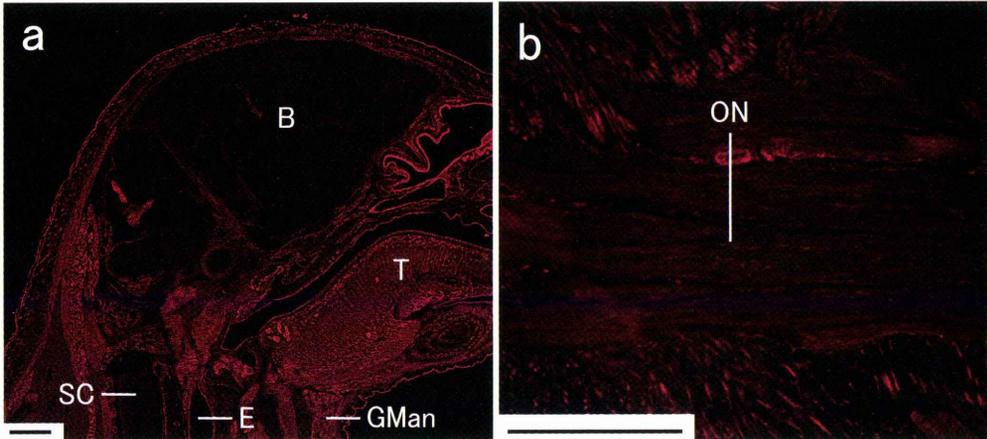


図7 tdTomato マウス頭頸部暗視野組織像

a) 中枢神経 (bar : 500 μ m) b) 末梢神経 (bar : 500 μ m) ON : 眼窩下神経

ものの、肝臓と脾臓では低い発現しか認められなかった (図4, b).

3. 生後7日齢 tdTomato マウス凍結連続切片による蛍光観察

凍結連続切片を作製していることから、マウス全身の H-E 染色像 (図5, a, c) で各臓器の位置を確認後、隣接切片にて暗視野での蛍光観察を行ったところ、全ての臓器で蛍光発現が観察された (図5, b, d).

各臓器の比較は次の通りである。

1) 口腔・頭頸部

咀嚼粘膜に分類される口蓋粘膜、特殊粘膜に分類される舌背粘膜、被覆粘膜に分類される舌下粘膜それぞれにおいて蛍光発現が観察され、粘膜機能による分類間で大きな差は認められなかった (図6, a)。横紋筋に分類される舌筋や舌骨筋群でも蛍光発現を認め (図6, b, c)、他の頭頸部の筋との大きな差は認めなかった。大唾液腺である顎下腺 (図6, d)、舌下腺 (図6, d)、耳下腺 (図6, e)、小唾液腺である口蓋腺 (図6, a)、涙腺 (図6, f) などの腺組織において蛍光発現を認めた。特に粘液腺である舌下腺、口蓋腺で強い蛍光発現を認めた。脳や脊髄の中枢神経 (図7, a) と末梢神経の眼窩下神経 (図7, b) では、他の頭頸部の臓器に比べ、蛍光発現が少なかった。また脳、脊髄では、灰白質と白質の差も認

められなかった。顎下腺、舌下腺に接して存在する顎下リンパ節の蛍光発現は顎下腺より低かった。

2) 胸腔

心臓、肺、胸腺、気管、食道上部、大動脈、大静脈、横隔膜など全ての臓器で蛍光が観察された。心筋や横隔膜を構成する骨格筋 (横紋筋)

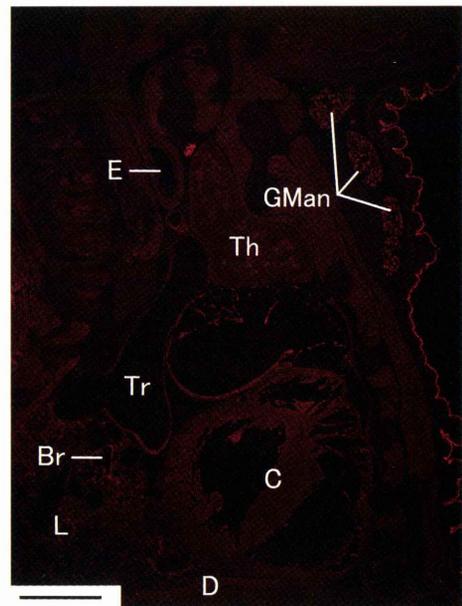


図8 tdTomato マウス胸腔諸臓器の暗視野組織像
D: 横隔膜、Th: 胸腺、Br: 気管支 (bar : 1 mm)

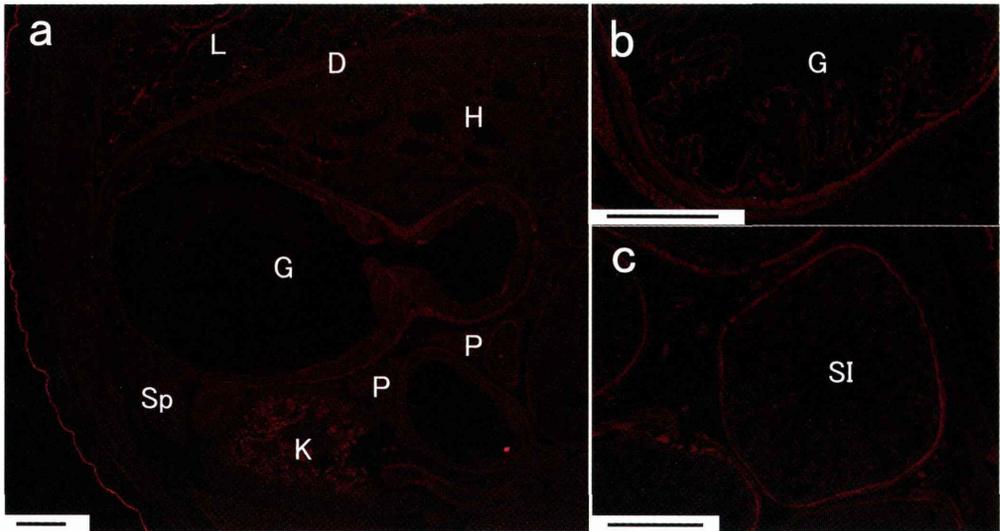


図9 tdTomato マウス腹腔諸臓器の暗視野組織像
 a) 腹腔後方 (bar: 500 μ m) b) 胃粘膜層拡大像 (bar: 500 μ m)
 c) 十二指腸拡大像 (bar: 500 μ m) Sp: 脾臓

間で蛍光の量に差は認めなかった (図8).

3) 腹腔

胃 (図9, a, b), 小腸 (十二指腸 (図9, c), 空腸, 回腸), 大腸 (盲腸, 結腸, 直腸), 肝臓, 腎臓, 脾臓, 膵臓 (図9, a) などの臓器全てにおいて蛍光発現が観察された. 消化管それぞれを構成する粘膜, 粘膜固有層, 粘膜下組織, 筋層 (平滑筋) の全てで, 蛍光発現が観察された.

考 察

近年, 生体試料での研究において, GFP, tdTomato, mCherry, などの様々な蛍光タンパクを用いたリアルタイムでのライブイメージングが行われている^{11,16,17}. 特に, tdTomato 発現細胞のもつ波長特性を活かし, ノードマウスなどの非蛍光性免疫機能不全マウスへの移植実験において, 生体深部における蛍光シグナルの検出や追跡にも適していると期待されている. それにより, 細胞レベルでの病態の解明や創剤を含めた治療法の生体内におけるリアルタイム評価などが可能となるため, 医歯薬領域の研究開発において重要なツールとなることが予測できる.

以上のように, tdTomato マウスは, この分野の研究には有用な動物であると推測されているが, 過去の報告は全て摘出臓器単位での蛍光イメージングであり, 切片による組織学的検索は行われていない. また各臓器における tdTomato mRNA 発現量を特定した報告はなく, 遺伝子発現レベルでの分子生物学的な解析による精査が必要とされている. そこで, 我々は, tdTomato マウス臓器単位での tdTomato 遺伝子発現の様子を切片レベルならびに mRNA レベルで比較検討した. さらに, 各臓器における tdTomato 遺伝子発現の様子を, 既存の EGFP マウス各臓器における EGFP 遺伝子発現の様子と比較検討し, tdTomato マウスの有用性について明らかにした.

IVIS[®] Lumina Imaging System と mRNA 発現量の比較

過去の報告のほとんどが蛍光イメージングによる臓器単位での発現の有無を検索しているのみであった. 本研究では, IVIS[®] Lumina Imaging System による蛍光シグナルを確認後, 同一臓器の一部を取り出して蛍光シグナルの強度と mRNA 発現量とを比較した. その結果,

tdTomato マウスから抽出されたほぼ全ての臓器において、IVIS[®] Lumina Imaging System による高い蛍光シグナル強度が認められ、tdTomato mRNA 発現量も蛍光シグナル強度と同様の傾向を示していた。

一方、EGFP マウスから抽出されたほとんどの臓器においても、IVIS[®] Lumina Imaging System による蛍光シグナルを認めたが、tdTomato マウスより臓器間で蛍光シグナル強度にばらつきがみられた。特に、膵臓では非常に高い蛍光シグナルを認めたのに対して、肝臓と脾臓では蛍光が全く検出されなかった。同様に EGFP mRNA 発現量も蛍光シグナルと同様の傾向を示し、膵臓で高く、肝臓と脾臓では低かった。しかしながら、tdTomato マウスおよび EGFP マウスの両者において、IVIS[®] Lumina Imaging System による蛍光シグナル強度とそれぞれの蛍光タンパクの mRNA 発現量が同様の傾向を示さない臓器も観察された。すなわち、tdTomato マウスから抽出された脾臓では蛍光シグナルが低かったのに対して、tdTomato mRNA 発現量は高かった。さらに、EGFP マウスでは、顎下リンパ節ならびに腎臓では蛍光シグナルが検出されないにも関わらず、高い EGFP mRNA 発現量を認めた。このような蛍光イメージングの結果と mRNA 発現量が同様の傾向を示さない理由は不明であるが、IVIS[®] Lumina Imaging System は、細胞の集積密度やタンパク質の重合度合いによって蛍光強度が大きく変化する可能性がある。さらには各臓器や臓器を構成する組織によって mRNA 転写後の調節機構や翻訳後修飾の過程において蛍光タンパクの発現量が調節され、その mRNA 発現量と必ずしも一致しない可能性が考えられる。tdTomato マウスはこれまでに報告されている EGFP マウスと異なり、Rosa26 遺伝子座に CAG プロモーターおよび tdTomato cDNA をターゲティングしてトランスジェニックマウスを作製している²⁴⁾。Rosa26 遺伝子座にターゲティングされた遺伝子は、マウスの発生段階および臓器・組織の

差に関わらず普遍的に発現することが報告されている³¹⁾。しかしながら、本研究では顎下リンパ節において mRNA 発現量が他臓器と比較して低く、さらには IVIS[®] Lumina Imaging System による蛍光観察および組織切片における観察においても弱い蛍光シグナルしか検出することができなかった。この理由として各臓器・組織における turn over の違いによる可能性を考えることができる。即ち、臓器および組織特異的にタンパク質の合成と分解による動的平衡の速度を調節する機構が異なり、その結果 tdTomato タンパク質の発現量ならびに蛍光シグナルに差異が出来る可能性が示唆される。また、Rosa26 遺伝子は non-coding RNA を発現しているという報告もあり³²⁾、これらの非翻訳性 RNA が臓器・組織特異的に tdTomato mRNA およびタンパク質の発現に関与している可能性も排除できない。

凍結連続切片での結果との比較

切片による観察において、ほとんどの臓器の細胞で蛍光発現を確認できた。切片では、舌下腺と口蓋腺で非常に強い蛍光発現を確認したが、他の外分泌腺では強くなかった。筋肉では、横紋筋、平滑筋、心筋による差を認めなかった。脳、脊髄では白質、灰白質による差を認めず mRNA 発現量の結果とも一致した。このように観察・計測方法によって同じ臓器であっても結果が異なるもの、一致するものがあり、安易に結論を出すことはできないが、今回の3つの方法で一致した臓器については、再生医療研究などで応用可能な臓器であると考えられる。一方、一致しなかった臓器については、mRNA 発現量の測定の方法論に関して転写後の調節が関与している可能性があると考えられ、さらに蛍光タンパク質の発現量を確認する必要があると考えている。切片での観察では、特に唾腺において、耳下腺・顎下腺と舌下腺・口蓋腺の間で蛍光発現が大きく異なったことから、分泌唾液の性状の違いによる蛍光発現強度の差である可能性もあり、今後さらなる検索が必要であると考える。

再生医療の研究においては、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞), 胚性幹細胞 (ES 細胞), 造血細胞由来幹細胞などが用いられることが多いが, tdTomato マウスの各臓器を組織レベルで観察し蛍光分布を特定し, それに加えて分子細胞生物学的データと複合的に検討, 考察することにより, 新たな臓器幹細胞の発見につながるも期待される。また癌研究分野においても tdTomato マウスを用いた発癌実験で赤色蛍光を放つ癌細胞の作製も可能となるため, この強蛍光標識癌細胞の動態をライブイメージングすることによって転移機序の解明にも寄与できるものと思われる。

結 論

tdTomato マウスと EGFP マウスの各臓器の蛍光シグナル強度を IVIS[®] Lumina Imaging System を用いて測定し, さらに, その同一試料における各蛍光タンパクの mRNA 発現量を計測した。tdTomato マウスについては生後 7 日齢を用いて, 全身の凍結連続切片を作製し, 切片における各臓器の組織レベルでも検索し, 蛍光イメージングならびに mRNA 発現量との比較を行い以下の結果を得た。

1. tdTomato マウスから摘出されたほぼ全ての臓器において, IVIS[®] Lumina Imaging System による高い蛍光シグナル強度が認められ, 多くの臓器で mRNA 発現量も蛍光シグナル強度と同様の傾向を認めた。
2. tdTomato マウスの臓器の中で脾臓において, mRNA 発現を認めたのに対して, 蛍光シグナルはほとんど確認できなかった。
3. tdTomato マウスと EGFP マウスの間では, 肝臓, 脾臓, 腎臓で tdTomato マウスの方が有用性が高いことが判明した。
4. tdTomato マウスの whole mount による切片観察では臓器, 組織によって強弱は認められるが, ほとんどの臓器の細胞で蛍光発現を確認できた。

蛍光イメージング, mRNA 発現量, 切片による観察の間で同様の傾向を示さない臓器も認め

られたことから, 今後, このような研究や検証には切片法を含めた複数の手法を用いる必要性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究の機会を与えていただき研究の遂行に終始ご懇意な教示と校閲を賜りました口腔保健育成学講座歯科矯正学分野 三浦廣行教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり御教示いただきました, 内科学講座血液・腫瘍内科分野 石田陽治教授, 生理学講座病態生理学分野 佐原資謹教授, 口腔保健育成学講座歯科矯正学分野 清野幸男准教授, 解剖学講座機能形態学分野 安藤禎紀博士, 生化学講座細胞情報科学分野 帖佐直幸博士, 大久保直登博士に衷心より感謝の意を表します。最後に, 御支援, 御協力をいただきました口腔保健育成学講座歯科矯正学分野, 解剖学講座機能形態学分野, 生化学講座細胞情報科学分野, 岩手医科大学歯歯薬総合研究所動物研究センターの皆様にご感謝いたします。本論文の要旨の一部は, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (平成 23 年 9 月 30 日~10 月 2 日, 岐阜) において発表した。本研究は, 文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業 (未来医療開発プロジェクト) の助成により実施された。

引用文献

- 1) Zhao, M., Yang, M., Ma, H., Li, X., Tan, X., Li, S., Yang, Z. and Hoffman, R. M.: Targeted therapy with a Salmonella typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Res.* 66 : 7647-7652, 2006.
- 2) Winnard, P. T. Jr., Kluth, J. B., Kato, Y., Artemov, D. and Raman, V.: Development of novel chimeric transmembrane proteins for multimodality imaging of cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 6 : 1889-1899, 2007.
- 3) Tam, J. M., Upadhyay, R., Pittet, M. J., Weissleder, R. and Mahmood, U.: Improved in vivo whole-animal detection limits of green fluorescent protein-expressing tumor lines by spectral fluorescence imaging. *Mol. Imaging* 6 : 269-276, 2007.
- 4) Yang, M., Li, L., Jiang, P., Moossa, A. R., Penman,

- S. and Hoffman, R. M.: Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 : 14259-14262, 2003.
- 5) Nowotshin, S., Eakin, G. S. and Hadjantonakis, A. K.: Live-imaging fluorescent proteins in mouse embryos: multi-dimensional, multi-spectral perspectives. *Trends Biotechnol.* 27 : 266-276, 2009.
 - 6) Yamauchi, K., Yang, M., Hayashi, K., Jiang, P., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., Tomita, K., Moossa, A. R., Bouvet, M. and Hoffman, R. M.: Imaging of nucleolar dynamics during the cell cycle of cancer cells in live mice. *Cell Cycle* 6 : 2706-2708, 2007.
 - 7) Tohill, M. P., Mann, D. J., Mantovani, C. M., Wiberg, M. and Terenghi, G.: Green fluorescent protein is a stable morphological marker for schwann cell transplants in bioengineered nerve conduits. *Tissue Eng.* 10 : 1359-1367, 2004.
 - 8) Hoffman, R. M.: Real-time subcellular imaging in live animals: new visible targets for cancer drug discovery. *I. Drugs* 9 : 632-635, 2006.
 - 9) Tecuapetla, F., Koós, T., Tepper, J. M., Kabbani, N. and Yeckel, M. F.: Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals. *J. Neurosci.* 29 : 8977-8990, 2009.
 - 10) 丹羽民和：動脈硬化領域における骨髄由来細胞領域の Green fluorescent protein (GFP) を用いた検討, 岐阜医療科学大学紀要, (1881-9168), 55-60, 2009.
 - 11) Winnard, P. T. Jr., Kluth, J. B. and Raman, V.: Noninvasive optical tracking of red fluorescent protein-expressing cancer cells in a model of metastatic breast cancer. *Neoplasia* 8 : 796-806, 2006.
 - 12) Shimomura, O. and Johnson, F. H.: Extraction, purification, and properties of the bioluminescence system of the euphausiid shrimp *Meganctiphanes norvegica*. *Biochemistry* 6 : 2293-2306, 1967.
 - 13) Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. and Ward, W. W.: Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32 : 1212-1218, 1993.
 - 14) Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. and Winant, J.: Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13 : 2656-2662, 1974.
 - 15) Jiang, P., Yamauchi, K., Yang, M., Tsuji, K., Xu, M., Maitra, A., Bouvet, M. and Hoffman, R. M.: Tumor cells genetically labeled with GFP in the nucleus and RFP in the cytoplasm for imaging cellular dynamics. *Cell Cycle* 5 : 1198-1201, 2006.
 - 16) Yang, M., Reynoso, J., Bouvet, M. and Hoffman, R. M.: A transgenic red fluorescent protein-expressing nude mouse for color-coded imaging of the tumor microenvironment. *J. Cell Biochem.* 106: 279-284, 2009.
 - 17) Tran, Cao, H. S., Reynoso, J., Yang, M., Kimura, H., Kaushal, S., Snyder, C. S., Hoffman, R. M. and Bouvet, M.: Development of the transgenic cyan fluorescent protein (CFP)-expressing nude mouse for "Technicolor" cancer imaging. *J. Cell Biochem.* 107: 328-334, 2009.
 - 18) Gertler, T. S., Chan, C. S. and Surmeier, D. J.: Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28 : 10814-10824, 2008.
 - 19) Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J.: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108 : 193-199, 1991.
 - 20) Araki, K., Imaizumi, T., Okuyama, K., Oike, Y. and Yamamura, K.: Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J. Biochem.* 122: 977-982, 1997.
 - 21) Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Nagy, A.: Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76 : 79-90, 1998.
 - 22) Suzuki, O., Hata, T., Takekawa, N., Koura, M., Takano, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Uchio-Yamada, K. and Matsuda, J.: Transgene insertion pattern analysis using genomic walking in a transgenic mouse line. *Exp. Anim.* 55 : 65-69, 2006.
 - 23) Noguchi, A., Takekawa, N., Einarsdottir, T., Koura, M., Noguchi, Y., Takano, K., Yamamoto, Y., Matsuda, J. and Suzuki, O.: Chromosomal mapping and zygosity check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking. *Exp. Anim.* 53 : 103-111, 2004.
 - 24) Ohtsuka, M., Ogiwara, S., Miura, H., Mizutani, A., Warita, T., Sato, M., Imai, K., Hozumi, K., Sato, T., Tanaka, M., Kimura, M. and Inoko, H.: Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res.* 38: e198, 2010.
 - 25) Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W. and Tsien, R. Y.: Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5 : 545-551, 2008.
 - 26) Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y.: Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22 : 1567-1572, 2004.
 - 27) Shu, X., Shaner, N. C., Yarbrough, C. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J.: Novel chromophores and buried charges control color in mFruits.

- Biochemistry 45 : 9639-9647, 2006.
- 28) Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. and Nishimune, Y. : Green mice as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett. 407 : 313-319, 1997.
- 29) Kawamoto, T. and Shimizu, M.: A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. Histochem. Cell Biol. 113 : 331-339, 2000.
- 30) Kawamoto, T.: Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. J. Histochem. Cytochem. 38: 1805-1814, 1990.
- 31) Friedrich, G. and Soriano, P.: Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev. 5: 1513-1523, 1991.
- 32) Casola, S. : Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. Methods Mol. Biol. 667: 145-163, 2010.

Anatomical analyses on the expression of the fluorescence in tdTomato transgenic mice

Yukinori KUWAJIMA, Masato OOTUKA*, Akira ISHIZAKI**, Akira FUJIMURA***

Division of Orthodontics, Department of Developmental Oral Health Science, School of Dentistry,
Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate, 020-8505, Japan

*Division of Basic Molecular Science and Molecular Medicine, Department of Molecular Life Science,
School of Medicine, Tokai University

143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan

**Division of Cellular Biosignal Sciences, Department of Biochemistry, Iwate Medical University
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-Cho, Shiwa-Gun, Iwate, 028-3694, Japan

***Division of Functional Morphology, Department of Anatomy, Iwate Medical University
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-Cho, Shiwa-Gun, Iwate, 028-3694, Japan

(Chief : Prof. Hiroyuki MIURA)

[Received : December 26, 2011 : Accepted : January 7, 2011]

Abstract : The red fluorescent transgenic mouse has given us a promising insight into regenerative medicine. Each organ of this animal has already been investigated by the method of using a fluorescent imaging system, but not by histological methods. First of all, we compared all the organs of the red fluorescent transgenic mouse with previous studies using enhanced green fluorescent protein (EGFP) mice by the IVIS Luminal Imaging. Next the expression levels of each organs mRNA was measured by RT-PCR. Further, the histological sections of the red fluorescent transgenic mice (7 days after-birth) were taken by light microscope. The results of the three methods were compared and the following findings were made : We found a discrepancy between the fluorescent imaging method which was used in past reports and the expression levels of mRNA and multiple discrepancies between these and the histological observations. Explaining the discrepancies was beyond the scope of this experiment. We thought that two or more methods including the histological examination were required by future research and verification. The red fluorescent transgenic mouse was more useful than the EGFP mouse in the fluorescent expression of the hepar, spleen and ren.

All of the organs in the red fluorescent transgenic mouse have a strong fluorescent expression. We hope that these red fluorescent transgenic mice are used in the research of regenerative medicine and the metastatic route of the tumor stem cell.

Key Words : dTomato, transgenic mouse, fluoresce microscopy, EGFP